



**PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK UMBI *Gynura pseudochina*
DOSIS BERTINGKAT TERHADAP PROLIFERASI LIMFOSIT
LIEN PADA MENCIT C_3H YANG DIINOKULASI
SEL ADENOKARSINOMA MAMMA**

ARTIKEL KARYA TULIS ILMIAH

**Diajukan untuk memenuhi tugas dan melengkapi persyaratan dalam menempuh program pendidikan
sarjana Fakultas Kedokteran**

**Disusun Oleh :
Lina Nur Irmawati
G2A002102**

**FAKULTAS KEDOKTERAN
UNIVERSITAS DIPONEGORO
SEMARANG
2006
HALAMAN PENGESAHAN**

Telah diuji pada tanggal 26 Juli 2006 dan telah diperbaiki sesuai dengan saran-saran yang diberikan, Artikel Karya Tulis Ilmiah dari :

Nama : Lina Nur Irmawati
 NIM : G2A002102
 Tingkat : Program Pendidikan Sarjana
 Fakultas : Kedokteran Umum
 Universitas : Diponegoro
 Bagian : Histologi
 Judul : PENGARUH PEMBERIAN EKSTRAK UMBI *Gynura pseudochina* DOSIS BERTINGKAT TERHADAP PROLIFERASI LIMFOSIT LIEN PADA MENCIT C_3H YANG DIINOKULASI SEL ADENOKARSINOMA MAMMA
 Dosen Pembimbing : dr. Ahmad Ismail, M.Si

Ketua Penguji Semarang, Agustus 2006
 Penguji,

dr. A. Zulfa Juniarto, M.Si, Med
 NIP : 132 163 896

dr. Ika Pawitra Miranti, M.Kes
 NIP. 131 875 465

Mengetahui,
 Dosen pembimbing

dr. Ahmad Ismail, M.Si
 NIP. 132 163 894

Pengaruh Pemberian Ekstrak Umbi *Gynura pseudochina* dosis bertingkat terhadap Proliferasi Limfosit Lien pada Mencit C3H yang Diinokulasi Sel Adenokarsinoma Mamma

Lina Nur Irmawati*, Ahmad Ismail**

ABSTRAK

Latar Belakang : Kanker payudara merupakan penyakit keganasan yang banyak diderita wanita saat ini. Angka morbiditas dan mortalitasnya masih cukup tinggi. Limfosit berperan sangat penting dalam mengendalikan pertumbuhan antigen sel tumor. Umbi *Gynura pseudochina* mengandung senyawa yang dapat meningkatkan proliferasi limfosit. Penelitian ini bertujuan untuk membuktikan pengaruh umbi *Gynura pseudochina* terhadap peningkatan proliferasi limfosit lien mencit C3H yang diinokulasi sel adenokarsinoma mamma.

Metoda : Jenis penelitian ini adalah eksperimental dengan rancangan the post test only control group design pada hewan coba mencit C3H yang terdiri dari 20 ekor mencit betina, dibagi menjadi 4 kelompok. K merupakan kelompok kontrol yang diinokulasi sel kanker. P1 adalah kelompok perlakuan yang diinokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan diberi umbi *Gynura pseudochina* 0,123 mg/hari selama 3 minggu. P2 adalah kelompok perlakuan yang diinokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan diberi umbi *Gynura pseudochina* 0,246 mg/hari selama 3 minggu. Sedangkan P3 adalah kelompok perlakuan yang diinokulasi sel kanker, setelah timbul benjolan diberi umbi *Gynura pseudochina* 0,492 mg/hari selama 3 minggu. Dan semua kelompok dilakukan isolasi limfosit lien, dihitung jumlah limfoblas setiap 200 sel pada area homogen.

Hasil : Terdapat perbedaan pada jumlah limfoblas yang bermakna antara kelompok K-P1, K-P2, K-P3, dan P1-P3. Tetapi juga tidak terdapat perbedaan pada jumlah limfoblas yang bermakna antara kelompok P1-P2 dan P2 -P3. Nilai $p \leq 0,05$ berarti ada perbedaan yang bermakna.

Kesimpulan : Pada pemberian ekstrak umbi *Gynura pseudochina* didapatkan peningkatan proliferasi limfosit lien yang bermakna pada mencit C3H yang diinokulasi sel adenokarsinoma mamma. Sedangkan pada pemberian ekstrak umbi *Gynura pseudochina* dosis bertingkat pada penelitian ini menunjukkan peningkatan proliferasi limfosit yang tidak bermakna.

Kata kunci : Proliferasi limfosit, *Gynura pseudochina*, Kanker payudara

* Mahasiswa Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

** Staf pengajar Bagian Histologi Fakultas Kedokteran Universitas Diponegoro

The Influence of Giving *Gynura pseudochina*'s Tubers Extract with stratified doses in Lymphocytes Proliferation of C3H Mice was Inoculated with Adenocarcinoma Mamma Cells

Lina Nur Irmawati*, Ahmad Ismail**

ABSTRACT

Background : Breast cancer was a malignant disease that was suffered by many women these days. Its morbidity and mortality rate was quite high. Lymphocytes had important role to inhibit cancer cells growth. *Gynura pseudochina*'s tubers consists of chemicals that were able to increase lymphocytes proliferation. The objective of this study was to show the influence of *Gynura pseudochina*'s tubers in lymphocytes proliferation of C3H mice was inoculated with adenocarcinoma mamma cell.

Method : An experimental study with the post-test only control group design was carried out on experiment animal C3H mice, consisted of 20 female mice which divided into 4 groups. K was control group inoculated with cancer cells. P1 was group inoculated with cancer cells, after a lump was formed then given *Gynura pseudochina*'s tubers 0,123 mg/day for 3 weeks. P2 was group inoculated with cancer cells, after a lump was formed then given *Gynura pseudochina*'s tubers 0,246 mg/day for 3 weeks. Whereas P3 was group inoculated with cancer cells, after a lump was formed then given *Gynura pseudochina*'s tubers 0,492 mg/day for 3 weeks. And lymphocytes from the spleen of all mice were isolated. Lymphoblasts were counted in every 200 cells of homogen.

Results : There was a significant different in lymphoblast count between K-P1, K-P2, K-P3, and P1-P3). But there was no significant different in lymphoblast count between P1-P2, nor P2-P3. Value of $p \leq 0,05$ showed that was a significant different.

Conclusion: : On the giving of *Gynura pseudochina*'s tubers extract there was a significant increase of

lymphocyte proliferation on C3H mice were inoculated with adenocarcinoma mamma cells. But, on the giving of Gynura pseudochina's tubers extract with stratified doses in this experimental showed no significant increase of lymphocyte proliferation.

Keywords: *Lymphocyte proliferation, Gynura pseudochina, Breast cancer*

* *Student of Medical Faculty of Diponegoro's University*

** *Lecturer of Histology Department Medical Faculty of Diponegoro's University*

PENDAHULUAN

Kanker adalah salah satu penyakit yang banyak menimbulkan kesengsaraan dan kematian pada manusia. Di negara-negara barat, kanker merupakan penyebab kematian nomor 2 setelah penyakit-penyakit kardiovaskular (AMA, 1990).¹ Di Indonesia kanker payudara berada di urutan kedua sebagai kanker yang paling sering ditemukan pada wanita, setelah kanker mulut leher rahim.^{2,3} Kanker rahim dan kanker payudara tetap menduduki tempat teratas. Selain jumlah kasus yang banyak, lebih dari 70% penderita kanker payudara ditemukan pada stadium lanjut.¹ Akhir-akhir ini masyarakat cenderung beralih pada pengobatan tradisional karena harganya relatif lebih murah dan manfaatnya memuaskan.⁴ Salah satunya yang diketahui adalah umbi *Gynura pseudochina* yang mengandung senyawa yang dapat meningkatkan proliferasi limfosit.

Sel kanker dikenal sebagai nonself yang bersifat antigenik pada sistem imunitas tubuh manusia sehingga akan menimbulkan respons imun secara seluler maupun humoral. Imunitas humoral lebih sedikit berperan daripada imunitas seluler, tetapi tubuh tetap membentuk antibodi terhadap antigen tumor. Sistem imun seluler yang berperan adalah limfosit T sitotoksik, sel NK (Natural Killer) dan makrofag.⁵

Limfosit T berperan sangat penting dalam mengendalikan pertumbuhan antigen sel tumor. Proliferasi limfosit T yang dirangsang oleh antigen, terutama diatur oleh pengaruh IL-2 terhadap reseptor IL-2 yang dimiliki pada permukaan selnya. Penelitian terbaru menunjukkan proliferasi limfosit T juga dapat terjadi tanpa melalui IL-2, misalnya melalui IL-4.⁶

Gynura pseudochina mengandung zat kimia antara lain *flavonoid*, *alkaloid*, *saponin*, *tanin*, dan *polifenol*.^{7,8} Penelitian membuktikan bahwa secara laboratoris senyawa *flavonoid* dapat meningkatkan aktivitas IL-2 dan meningkatkan proliferasi limfosit.⁹

Penelitian ini diharapkan dapat memperjelas pengaruh umbi *Gynura pseudochina* dalam memodulasi sistem imun dan pengaruhnya terhadap pertumbuhan kanker payudara pada mencit C3H, sehingga dapat menjadi tambahan informasi dalam pertimbangan konsumsi tanaman obat, dan dapat menjadi acuan untuk penelitian selanjutnya.

METODE PENELITIAN

Jenis penelitian ini adalah penelitian eksperimental dengan rancangan *the post test only control group design*. Menggunakan 4 kelompok, yaitu 1 kelompok kontrol dan 3 kelompok perlakuan, dengan randomisasi sederhana. Penilaian dilakukan hanya pada saat *post test*, dengan membandingkan hasil observasi pada kelompok perlakuan dan kontrol.

Sampel penelitian diambil secara acak (random) dari populasi terjangkau dengan kriteria inklusi sebagai berikut: mencit strain C3H betina, umur 6 bulan, sehat, dan berat ± 30 gram. Berdasarkan ketentuan WHO jumlah sampel 5 ekor per kelompok. Sehingga jumlah total sampel sebanyak 20 ekor.

Mencit C3H sebanyak 20 ekor dibagi menjadi 4 kelompok, masing-masing kelompok terdiri atas 5 ekor. Tiap kelompok mencit dikandangkan secara individual dan mendapatkan pakan standard yang sama dan minum ad libitum. Lima kelompok mencit tersebut adalah :

- | | |
|--------------------|---|
| Kontrol (K) | : diinokulasi sel kanker |
| Perlakuan I (P1) | : diinokulasi dengan sel kanker, setelah timbul benjolan kemudian diberi ekstrak umbi <i>Gynura pseudochina</i> 0,123 mg/hari peroral selama 3 (tiga) minggu. |
| Perlakuan II (P2) | : diinokulasi dengan sel kanker, setelah timbul benjolan kemudian diberi ekstrak umbi <i>Gynura pseudochina</i> 0,246 mg/hari peroral selama 3 (tiga) minggu. |
| Perlakuan III (P3) | : diinokulasi dengan sel kanker, setelah timbul benjolan kemudian diberi ekstrak umbi <i>Gynura pseudochina</i> 0,492 mg/hari peroral selama 3 (tiga) minggu. |

Kemudian mencit dibunuh untuk dilakukan pengambilan/isolasi splenosit (lien), kemudian dilakukan pemeriksaan limfosit dengan menghitung jumlah limfoblas dalam 200 sel pada area homogen limfosit lien dari kelompok perlakuan dibanding dengan kelompok kontrol.

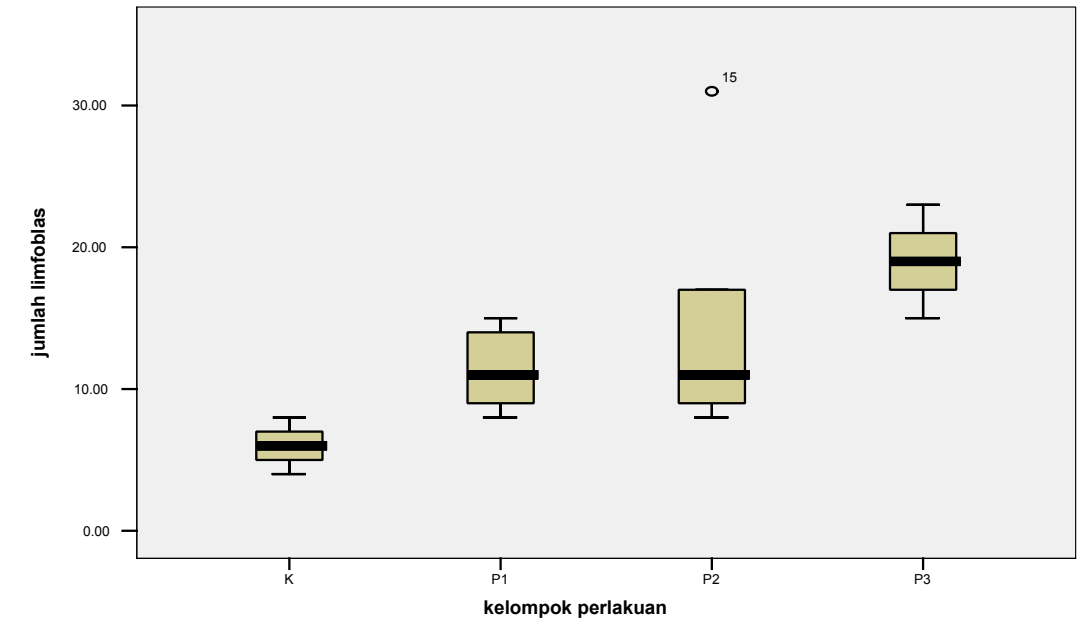
Analisa statistik yang digunakan adalah statistik non parametrik, yaitu uji *Kruskal Wallis* dan uji *Mann Whitney U*. Nilai signifikansi pada penelitian ini adalah apabila variabel yang dianalisis memiliki nilai $p \leq 0,05$.

HASIL

Hasil penghitungan jumlah limfoblas dalam 200 sel pada area homogen limfosit lien semua kelompok ditampilkan pada Tabel 1 dan Gambar 1.

Tabel.1 Jumlah limfoblas semua kelompok mencit

No	K	P1	P2	P3
1	8	11	17	23
2	6	15	11	17
3	5	8	8	21
4	4	9	9	15
5	7	14	31	19
Rerata ± SD	6 ± 1,6	11,4 ± 3,1	15,2 ± 9,5	19 ± 3,2



Gambar. 1 Grafik rerata jumlah limfoblas

Tabel 1 dan Gambar 1 menunjukkan bahwa rata-rata jumlah limfoblas pada kelompok P2 lebih besar dibandingkan dengan kelompok P1, demikian juga pada kelompok P3 dibandingkan dengan kelompok P1, dan kelompok P3 dibandingkan dengan kelompok P2. Sedangkan rata-rata jumlah limfoblas pada kelompok P lebih besar dibandingkan dengan kelompok K. Sedangkan rerata tertinggi ditemukan pada kelompok P3.

Uji *Kruskal Wallis* untuk perbandingan lebih dari dua sampel independen didapatkan hasil $p=0,004$ ($p<0,05$) artinya terdapat perbedaan yang bermakna. Selanjutnya dilanjutkan dengan uji *Mann Whitney U* untuk membandingkan tiap dua independen sampel.

Tabel. 2 Nilai p dari uji statistik *Mann Whitney U* jumlah limfoblas

	K	P1	P2
P1	0,012*		
P2	0,012*	0,673	
P3	0,009*	0,012*	0,209

* Bermakna

Selanjutnya pada uji *Mann Whitney U* (Tabel 2) dapat dilihat bahwa jumlah limfoblas pada kelompok K dibandingkan dengan kelompok P1 terdapat perbedaan yang bermakna ($p=0,012$), begitu juga antara kelompok K dengan kelompok P2 ($p=0,012$), antara kelompok K dengan kelompok P3 ($p=0,012$), dan antara kelompok P1

dengan kelompok P3 ($p=0,012$). Tetapi juga tidak terdapat perbedaan yang bermakna antara kelompok P1 dibanding dengan kelompok P2 ($p=0,673$), begitu juga antara kelompok P2 dengan kelompok P3 ($p=0,209$).

PEMBAHASAN

Hasil penelitian ini menunjukkan bahwa pada mencit kelompok perlakuan yang diinokulasi sel adenokarsinoma mamma dengan pemberian ekstrak umbi *Gynura pseudochina* dibanding dengan kelompok kontrol yang diinokulasi sel adenokarsinoma mamma tanpa pemberian *Gynura pseudochina* mempunyai kecenderungan peningkatan jumlah limfoblas yang bermakna pada lien mencit yaitu kelompok K dibanding dengan kelompok P1 yang diinokulasi sel adenokarsinoma mamma dengan pemberian ekstrak umbi *Gynura pseudochina* sebanyak 0,123 mg/hari selama 3 minggu ($p=0,012$), kelompok K dibanding dengan kelompok P2 yang diinokulasi sel adenokarsinoma mamma dengan pemberian ekstrak umbi *Gynura pseudochina* sebanyak 0,246 mg/hari selama 3 minggu ($p=0,012$), dan kelompok K dibanding dengan kelompok P3 yang diinokulasi sel adenokarsinoma mamma dengan pemberian ekstrak umbi *Gynura pseudochina* sebanyak 0,492 mg/hari selama 3 minggu ($p=0,009$). Sedangkan rerata rerata jumlah limfoblas tertinggi ditemukan pada kelompok P3. Jumlah relatif limfoblas yang tinggi dapat diasumsikan bahwa jumlah limfosit juga akan tinggi. Hal ini membuktikan bahwa pemberian ekstrak umbi *Gynura pseudochina* berpengaruh pada sistem imun seluler karena mampu meningkatkan proliferasi limfosit.

Antara kelompok perlakuan sendiri tidak didapatkan peningkatan jumlah limfoblas yang bermakna. Hal ini mungkin disebabkan dosis yang digunakan dalam penelitian memiliki rentang yang terlalu sempit dan masih dalam dosis terapi.

Respon imunologik terhadap kanker terutama diperankan oleh respon imun seluler. Sel imun yang berperan adalah sel limfosit T sitotoksik, sel NK (*Natural Killer*) dan makrofag yang banyak ditemukan disekitar jaringan tumor dan di darah perifer.⁵ Lien merupakan jaringan limfoid terbesar dan berperan penting dalam sistem imun khususnya dalam proliferasi dan diferensiasi limfosit T.¹⁰ Sehingga peningkatan proliferasi limfosit dapat dipakai sebagai indikator peningkatan aktivitas sistem imun melawan sel kanker.

Kandungan kimia yang terdapat dalam *Gynura pseudochina* salah satunya adalah flavonoid yang terbukti secara laboratoris dapat meningkatkan aktivitas IL-2 dan meningkatkan proliferasi limfosit.⁹

KESIMPULAN

Dari penelitian ini dapat disimpulkan bahwa :

1. Pemberian ekstrak umbi *Gynura pseudochina* pada mencit C3H yang diinokulasi sel adenokarsinoma mamma mempunyai pengaruh dalam meningkatkan proliferasi limfosit.
2. Pemberian dosis bertingkat (0,123 mg; 0,246 mg; 0,492 mg) tidak menunjukkan adanya peningkatan jumlah yang bermakna terhadap proliferasi limfosit pada lien mencit C3H yang diinokulasi sel adenokarsinoma mamma.
3. Pemberian ekstrak umbi *Gynura pseudochina* dosis 0,492 mg/hari pada mencit C3H yang diinokulasi sel adenokarsinoma mamma mempunyai pengaruh yang paling tinggi dalam meningkatkan proliferasi limfosit.

SARAN

1. Perlu dilakukan penelitian lebih lanjut mengenai pemberian ekstrak umbi *Gynura pseudochina* pada mencit C3H yang diinokulasi sel adenokarsinoma mamma dengan rentang dosis bertingkat yang lebih besar.
2. Perlu dilakukan uji toksisitas dan penentuan LD 50 umbi *Gynura pseudochina* sehingga bisa diketahui batas keamanan penggunaannya.

UCAPAN TERIMA KASIH

Penulis mengucapkan terima kasih setulus-tulusnya kepada dr. Ahmad Ismail atas bimbingannya sehingga penulis dapat menyelesaikan artikel ini. Kepada dr. Ika Pawitra Miranti, MKes sebagai reviewer proposal penelitian. Kepada seluruh staf bagian Histologi dan Laboratorium Bioteknologi yang telah membantu pelaksanaan ini. Kepada keluarga dan teman-teman (khususnya yang bekerjasama sekelompok dalam membuat

karya tulis ilmiah : Latifah Evi N, Lidya Sabig, Lusiana Batubara, dan Maria Ayu S), serta pihak-pihak yang tidak bisa disebutkan satu-persatu yang telah memberikan dorongan moral dan material hingga selesai pembuatan karya ilmiah ini.

DAFTAR PUSTAKA

1. Pane M. Aspek klinis dan epidemiologis penyakit kanker payudara. Available at: URL: <http://www.tempo.co.id/medika/arsip/082002/pus-3.htm>
2. Djoerban Z, Rose L, Poetiray E, Soehartati. Kanker payudara, yang penting dan perlu diketahui. *Medicinal Jurnal Kedokteran* 2003; 4(2).
3. Sarjadi, Trihartini P. Cancer registration in Indonesia. *Asian Pasific J Cancer Prev, IACR Supplement* 2001;2:21-24.
4. Winarto W P. Mahkota dewa budi daya dan pemanfaatan untuk obat. Jakarta: Penebar Swadaya, 2003.
5. Halim B, Sahil F. *Imunologi kanker*. *Cermin Dunia Kedokteran* 2001;132.
6. Baratawidjaja K. *Imunologi dasar*. Ed 6. Jakarta: Balai Penerbit Fakultas Kedokteran Universitas Indonesia, 2004.
7. Winarto WP. *Daun dewa budi daya dan pemanfaatan untuk obat*. Jakarta: Penebar Swadaya, 2003.
8. Suharmiati, Maryani H. *Khasiat dan Manfaat Daun Dewa dan sambung Nyawa*. Agromedia Pustaka; 2004
9. Jiao Y, Wen J, Yux. Influence of flavanoid of *Astragalus membranaceus*'s stem and leaves on the function of cell mediated immunity in mice. Available at: URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>
10. Junqueira LC, Carneiro J, Kelley RO. *Histologi dasar*. Ed 8. Jakarta: EGC, 1997; 270-6.

LAMPIRAN 1 :**CARA PEMBUATAN EKSTRAK UMBI *Gynura pseudochina***

1. Bahan umbi *Gynura pseudochina* yang telah dipotong kecil (± 1 kg) dimasukkan dalam alat soklet sedikit demi sedikit sesuai dengan kapasitas alat (50gr). Kemudian dilakukan ekstraksi dengan pelarut ethanol hingga larutan menjadi bening (tiap sampel dilakukan 8-10 kali sirkulasi).
2. Larutan ekstrak umbi *Gynura pseudochina* yang sudah jadi dipindahkan kedalam labu *rotary evaporator* dan dilakukan destilasi vakum hingga menjadi pekat dengan suhu 40°C .
3. Larutan yang sudah pekat tersebut dikeringkan dalam oven pada suhu 40°C selama 1jam untuk menghilangkan alkoholnya.
4. Setelah kering didapatkan crude total sebanyak 1,23% dari 1 kg umbi *Gynura pseudochina* yaitu kurang lebih 12,3 gram ekstrak umbi *Gynura pseudochina*

LAMPIRAN 2

KONVERSI PERHITUNGAN DOSIS UNTUK BERBAGAI JENIS HEWAN DAN MANUSIA

(LAURENCE & BACHARACH; 1964)

	Menci t 20 gr	Tikus 200 gr	Marmot 400 gr	Kelinci 1,5 kg	Kucing 2 kg	Kera 4 kg	Anjing 12 kg	Manusia 70 kg
Mencit 20 gr	1,0	7,0	12,25	27,8	29,7	64,1	124,2	387,9
Tikus 200 gr	0,14	1,0	1,74	3,9	4,2	9,2	17,8	56,0
Marmot 400 gr	0,08	0,57	1,0	2,25	2,4	5,2	10,2	31,5
Kelinci 1,5 kg	0,04	0,25	0,44	1,0	1,08	2,4	4,5	14,2
Kucing 2 kg	0,03	0,23	0,41	0,92	1,0	2,2	4,1	13,0
Kera 4 kg	0,016	0,11	0,19	0,42	0,45	1,0	1,9	6,1
Anjing 12 kg	0,008	0,06	0,10	0,22	0,24	0,52	1,0	3,1
Manusia 70 kg	0,0026	0,018	0,031	0,07	0,076	0,16	0,32	1,0

LAMPIRAN 3

PERHITUNGAN DOSIS EKSTRAK UMBI *Gynura pseudochina*

Faktor konversi dosis pada manusia yang beratnya 70 kg ke mencit yang berat badannya 20 gram adalah : 0,0026 (Laurence & Bacharach, 1964)

Dosis umbi *Gynura pseudochina* ditentukan berdasarkan dosis yang dianjurkan pada manusia yaitu 6-9 gram umbi segar.

Perhitungan :

Umbi *Gynura pseudochina* 6-9 gram, diambil dosis rata-ratanya 7,5 gram (7500 mg)

Faktor konversi = 0,0026

Dosis umbi *Gynura pseudochina* untuk mencit 20 gram adalah

$$= 0,0026 \times 7.500 \text{ mg}$$

$$= 19,5 \text{ mg} \sim 20 \text{ mg}$$

Umbi *Gynura pseudochina* disiapkan dalam 3 besaran dosis kelipatan 2 untuk tiap kelompok, yaitu 10; 20; 40 mg.

Hasil ekstrak 1 Kg umbi *Gynura pseudochina* sebesar 12,3 gram maka:

$$\text{Prosentase} = \frac{12,3}{1000} \times 100 \% = 1,23 \%$$

Jadi pemberian dosis ekstrak umbi *Gynura pseudochina* adalah :

$$\begin{aligned} \text{Kelompok perlakuan 1 (P1) diberi dosis} &= 10 \text{ mg} \times 1,23 \% \\ &= 0,123 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kelompok perlakuan 2 (P2) diberi dosis} &= 20 \text{ mg} \times 1,23 \% \\ &= 0,246 \text{ mg} \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{Kelompok perlakuan 3 (P3) diberi dosis} &= 40 \text{ mg} \times 1,23 \% \\ &= 0,492 \text{ mg} \end{aligned}$$

PENGENCERAN EKSTRAK

1,968 mg/cc ~ 120 cc

- Kelompok perlakuan 1 (P1) = 0,492 mg/cc ~ 0,123 mg/0,25 cc
- Kelompok perlakuan 2 (P2) = 0,984 mg/cc ~ 0,246 mg/0,25 cc
- Kelompok perlakuan 3 (P3) = 1,968 mg/cc ~ 0,492 mg/0,25 cc

LAMPIRAN 4

PROSEDUR TRANSPLANTASI JARINGAN TUMOR PADA MENCIT

▪ Alat :

1. Cawan petri ukuran 6 Cm
2. Cawan petri ukuran 15 Cm
3. Cawan ukuran 10 Cm
4. Sepuit 1 cc
5. Jarum suntik trocar
6. Gunting lurus 10 Cm
7. Gunting bengkok 10 Cm
8. Pinset anatomi 10 Cm
9. Pinset biasa 12 Cm
10. Alas fiksasi

▪ Bahan :

1. Alkohol 70 %
2. Larutan Garam fisiologik
3. Es batu
4. Mencit donor bertumor
5. Mencit resipien

▪ Prosedur :

1. Mencit donor dimatikan dengan eter, kemudian diletakkan terlentang pada tatakan / alas fiksasi dan keempat kakinya difiksasi dengan jarum.

2. Kulit dibagian yang bertumor diusap dengan alkohol 70 %, kemudian dibuat sayatan dengan gunting lurus, untuk mengeluarkan tumor.
3. Tumor diletakkan di cawan petri kecil yang telah terlebih dahulu dicuci dengan garam fisiologis dan diletakkan diatas es.
4. Amati bentuk dan keadaan tumor, kemudian ambil/potong jaringan tumor yang masih baik yaitu bagian yang tanpa nekrosis (biasanya di daerah tepi jika tumor besar) sebanyak kira-kira yang dapat menghasilkan bubur tumor paling sedikit 1 ml dan taruh dicawan petri kecil lainnya. Bersihkan dari jaringan ikat (simpai), jaringan nekrotik dan darah, kemudian cacah/potong-potong sampai halus dengan gunting hingga akhirnya terbentuk “bubur tumor” yang partikelnya dapat melewati jarum trokar. Tambahkan garam fisiologis lebih kurang sama banyak dengan volume tumor.
5. Bubur tumor disuntikkan subkutan di aksila kanan mencit dengan dosis 0,2 ml.
6. Sisa tumor yang padat dimasukkan ke dalam botol formalin untuk dibuat sediaan mikroskopik.

Sumber : Petunjuk Praktikum Patologi Anatomi FKUI

LAMPIRAN 5 :

PROSEDUR ISOLASI SPLENOSIT MENCIT

Metode Mishell (1980) dan Ding (1984)

■ Alat:

1. Pemanas alkohol
2. Beaker glass volume 50-70 ml
3. Gunting
4. Pinset
5. Petri dishes plastik
6. Refrigerated centrifuge
7. Pipet Pasteur

8. *Laminar flow hood*

■ Bahan :

1. NH_4Cl
2. PBS (*Phosphat Buffer Saline*)

■ Prosedur :

1. Rendam gunting dan pinset dalam ethanol 95 %. Gunting peritoneum dengan irisan berbentuk huruf U mengelilingi limpa. Peritoneum dilipat ke atas, angkat limpa dengan menggunakan pinset. Pisahkan limpa dari pembuluh darah dan jaringan sekitarnya menggunakan gunting. Letakkan limpa pada petri dish berisi 1,5 ml PBS.
2. Hancurkan limpa menggunakan pinset.
3. Dengan menggunakan pipet Pasteur, pindahkan suspensi sel ke tabung pemusing. Biarkan sel-sel yang mengumpal mengendap selama 5 atau 6 menit.
4. Pindahkan suspensi sel ke tabung yang lain dan pusingkan sel pada kecepatan 200 xg selama 10 menit pada suhu 4°C. Pellet yang didapat diresuspensikan dalam 2 ml *lysing buffer* pada suhu ruang ($\pm 25^\circ\text{C}$) untuk melisiskan eritrosit, lalu pusingkan pada kecepatan 200 xg selama 10 menit pada suhu 4°C.
5. Buang supernatan dan pellet dicuci 2x dengan PBS dengan cara dipipet berulang-ulang dan dipusingkan pada kecepatan 200 xg selama 10 menit pada suhu 4°C
6. Hitung sel-sel dengan menggunakan hemasitometer dengan kepadatan 3×10^7 sel/ml.

LAMPIRAN 6

PROSEDUR PEMERIKSAAN PROLIFERASI LIMFOSIT

(Burleson, et al, 1995)

■ Alat dan Bahan

1. Splenosit
2. Object glass
3. Pipet
4. Giemsa
5. Mikroskop cahaya + foto preparat

■ Prosedur pemeriksaan Proliferasi limfosit :

1. Teteskan 1 tetes pada object glass, untuk dibuat sediaan hapus, keringkan di udara
2. Fiksasi dengan methanol
3. Cat dengan giemsa

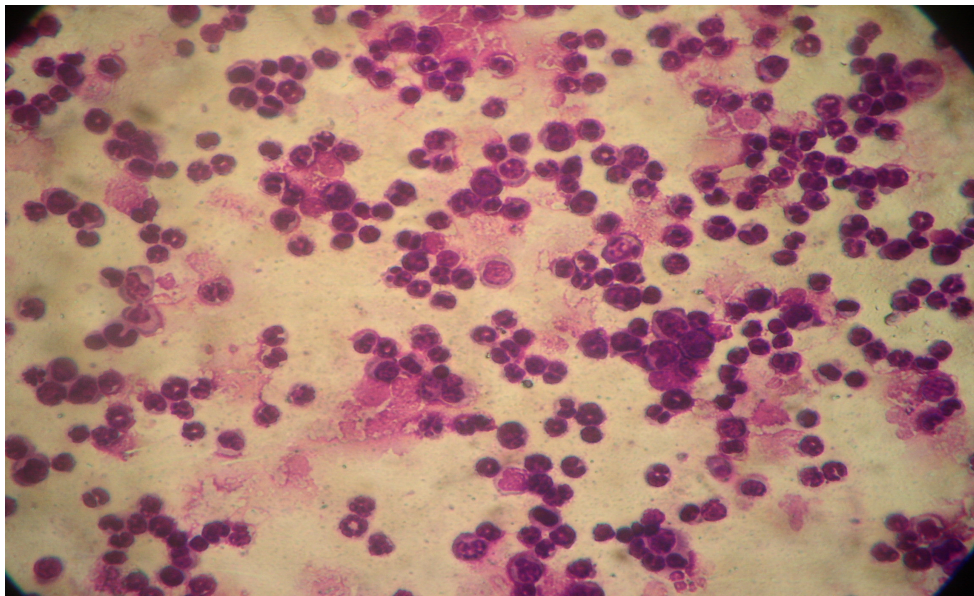
LAMPIRAN 7

Foto preparat limfosit lien perbesaran 400x, anak panah biru menunjukkan limfoblas dan anak panah merah menunjukkan limfosit

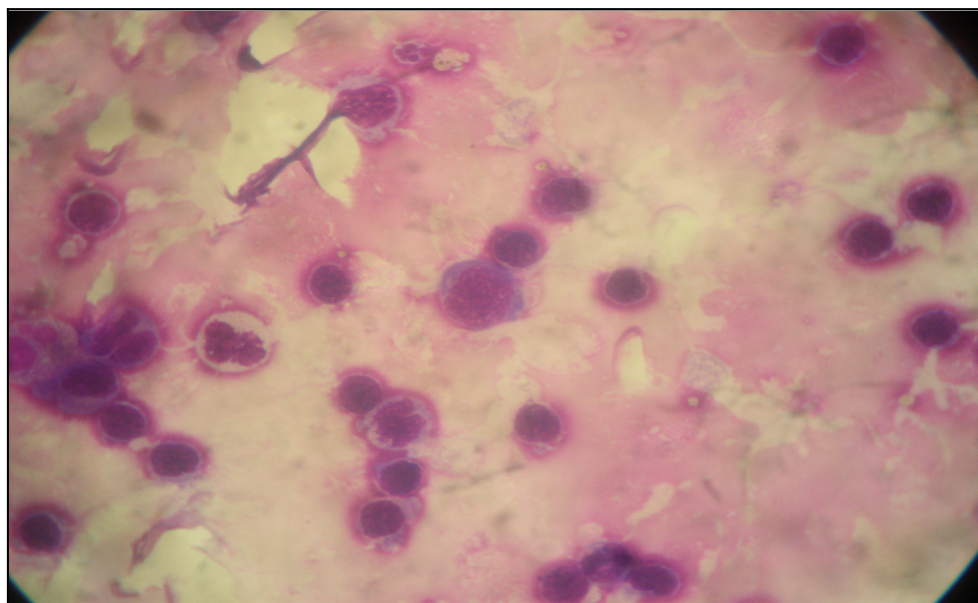


Foto preparat limfosit lien perbesaran 1000x anak panah biru menunjukkan limfoblas dan anak panah merah menunjukkan limfosit.